製品コード 6632

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR FLT3/ITD Mutation Detection Set

説明書

v201210Da

本製品は、FLT3（FMS-like tyrosine kinase 3）遺伝子の JM（Juxtamembrane）領域周辺に起こる Internal Tandem Duplication（ITD）変異の有無を検出するためのセットです。FLT3 遺伝子の ITD 変異は、急性骨髄性白血病（AML）の約 1/3 の症例および骨髄異形性症候群（MDS）の約 3%の症例に認められることが報告されています。その変異は JM 領域の exon11 に集中し、その他 intron11 や exon12 にも認められています。本製品のプライマーは、exon11 から exon12 の全領域を増幅できるようにデザインされており、ITD 変異をもれなく検出することができます。骨髄液または血液から得られたゲノム DNA を検体とし、PCR 法で増幅し、アガロースゲル電気泳動法または Agilent2100 バイオアナライザで増幅産物の長さを判定します。ゲノム DNA 中に 5 ～ 10%の ITD 変異が存在すれば変異を検出することができます。また、本製品には正常および変異コントロールが含まれており、解析精度の確認を行うことができます。
AML において、この変異を有する症例は予後不良であることが報告されています。現在、FLT3 のキナーゼ活性を特異的に阻害する分子標的薬の開発が進められており、本製品はこれら分子標的薬の研究開発に有用な試薬です。

I. セットの内容（50 反応用）

（1）FLT3/ITD-1 Primer	（10 pmol/μl）	50 μl（50 回分）
（2）FLT3/ITD-2 Primer	（10 pmol/μl）	50 μl（50 回分）
（3）Control Template（Mutant）	（1 pg/μl）	10 μl（10 回分）
（4）Control Template（Normal）	（1 pg/μl）	10 μl（10 回分）

II. 保存　　－ 20℃

III. セット以外に必要な試薬・器具（主なもの）

【試薬】
- *TaKaRa Ex Taq*（製品コード RR001A）
- アガロース［NuSieve™ 3 : 1 Agarose（製品コード 50091）など］
- 電気泳動用 buffer（TAE buffer）
- DNA マーカー［100 bp DNA ladder（製品コード 3407A/B）］
- Loading buffer（6 ×：36% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 30 mM EDTA）（上記の DNA マーカーには添付されている）
- DNA 染色剤［SYBR® Green I（製品コード 50512/50513）、GelStar® Nucleic Acid Stain（製品コード 50535）またはエチジウムブロマイド］

【機器】
- サーマルサイクラー（authorized instruments）
  TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient/Standard（製品コード TP600/TP650）
  TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini（製品コード TP100）
- 電気泳動装置
  Mupid®-2plus（製品コード M-2P）
  Mupid®-exU（製品コード EXU-1）
- UV トランスイルミネーター（300 nm 前後のもの）
- 電気泳動ゲル撮影用ポラロイドカメラ（SYBR® Green I、GelStar® Nucleic Acid Stain を使用される場合は専用のフィルターが必要です。）

【器具】
- 0.2 ml PCR tube［0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）］
- 0.5 ml,1.5 ml マイクロチューブ
- 耐エアロゾル性マイクロピペットおよびチップ

【Agilent2100 バイオアナライザを使用する場合】
- Agilent2100 バイオアナライザ
- Agilent DNA1000 LabChip キット

IV. 操作

A. 骨髄液、血液からのゲノム DNA の調製

骨髄液、血液から下記の方法 などの標準的な方法によりゲノム DNA を調製してください。骨髄液、血液の採取の際は抗凝固剤としてヘパリンは使用しないでください。ヘパリンは PCR 反応を阻害します。EDTA-2Na 等を使用してください。ゲノム DNA の調製の際には、赤血球成分の混入に注意してください。赤血球成分の混入は PCR 反応を阻害することがあります。

1. 骨髄液 1 ml、あるいは血液 5 ml を 1500 rpm, 5 分間遠心し、細胞沈殿を得る。
2. 沈殿を Hemolysis Buffer ＊[1] 5 ml で洗浄し、1500 rpm, 10 分間遠心し、細胞沈殿を得る。
   ＊ 1：Hemolysis Buffer : 10 mM Tris-HCl（pH7.6）, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl
3. 2. の洗浄を 2 回繰り返す。
4. 細胞沈殿に Lysis Buffer ＊[2] 1.5 ml 加え、37℃ , 2 時間インキュベーションする。
   ＊ 2：Lysis Buffer：10 mM Tris-HCl（pH7.6）, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K
5. 等量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）を加えよく撹拌し、12000 rpm, 5 分間遠心する。
6. 上清（水層）を別のチューブに回収し、等量のクロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を加えよく撹拌し、12000 rpm, 5 分間遠心する。
7. 上清（水層）を別のチューブに回収し、5 M NaCl 30 μl, イソプロパノール 0.9 ml を加え、よく撹拌する。
8. 12000 rpm, 5 分間遠心し、沈殿を回収する。
9. 沈殿を 70% エタノールで洗浄し、軽く乾燥させる。
10. 沈殿を TE Buffer で溶解し、DNA サンプルを得る。

B. PCR

1. 以下の手順で試薬を加えて混合し、0.2 ml PCR tube に反応液を準備する。

	1 反応あたりの量
10 × *Ex Taq* Buffer（Mg^{2+} plus）＊[1]	5 μl
dNTP Mixture（各 2.5 mM）＊[1]	4 μl
FLT3/ITD-1 Primer（10 pmol/μl）	1 μl
FLT3/ITD-2 Primer（10 pmol/μl）	1 μl
TaKaRa Ex Taq（5 U/μl）	0.25 μl
ゲノム DNA ＊[2]	0.1 μg
滅菌蒸留水	up to 50 μl

＊ 1：*TaKaRa Ex Taq* に付属
＊ 2：Control Template の場合は 1 μl を加える。

2. 以下の条件で PCR を行う。

94℃	30 sec.	35 cycles
56℃	30 sec.	
72℃	30 sec.	
↓		
72℃	5 min.	

C. アガロースゲル電気泳動による解析

PCR 増幅産物を 5 μl 取り、3% NuSieve™ 3 : 1 Agarose（TAE）を用いて電気泳動を行う。分子量マーカーには 100 bp DNA Ladder を用いる。泳動後、エチジウムブロマイドなどで染色し、UV トランスイルミネーターにて増幅バンドを検出する。
Control Template の Normal と Mutant の分離が明確に識別できない場合は泳動条件に問題があることが考えられる。ゲル濃度を確認し、泳動時間を延ばすなどの改善を行う。

増幅断片サイズ

サンプル	増幅サイズ
正常検体	329 bp
ITD 変異検体	329 bp（正常）と 347 ～ 419 bp（ITD 変異）＊3
Control Template（Normal）	329 bp
Control Template（Mutant）	359 bp

＊3：ITD 変異検体では通常、正常（329 bp）と ITD 変異（347 ～ 419 bp）の 2 バンドが検出されるが、検体によっては ITD 変異のみが検出される場合がある。

D. Agilent2100 バイオアナライザによる解析

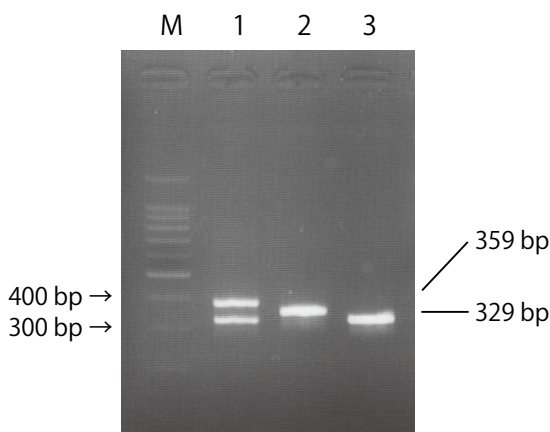
Agilent2100 バイオアナライザの使用は、装置添付の取扱説明書に従って行ってください。

1. PCR 増幅産物を TE buffer で希釈し、0.5 ～ 50 ng/μl（2 ～ 10 倍希釈）の濃度に調製する。
2. DNA1000 LabChip キット取扱説明書に従い、Gel-Dye Mix を調製する。
3. チップ調製スタンドを準備し、クリップストッパーの位置を合わせる。
4. LabChip に Gel-Dye Mix を注入する。
5. LabChip にマーカーおよびラダーを入れる。
6. LabChip に希釈した増幅サンプルを 1 μl 入れる。
7. LabChip 専用ミキサーで 1 分間撹拌する。
8. バイオアナライザに LabChip をセットし、アッセイメニューから DNA 1000 を選択し、分析を開始する。最大 12 サンプルで約 30 分間程度で分析と解析が完了する。
9. 前述の増幅断片サイズを参照し、バイオアナライザ分析チャート上で Control Template（Normal）のピークと比較して、長鎖長側にさらにピークが認められる場合は ITD 変異陽性と判定される。

V. 実験例

A. 電気泳動による解析例

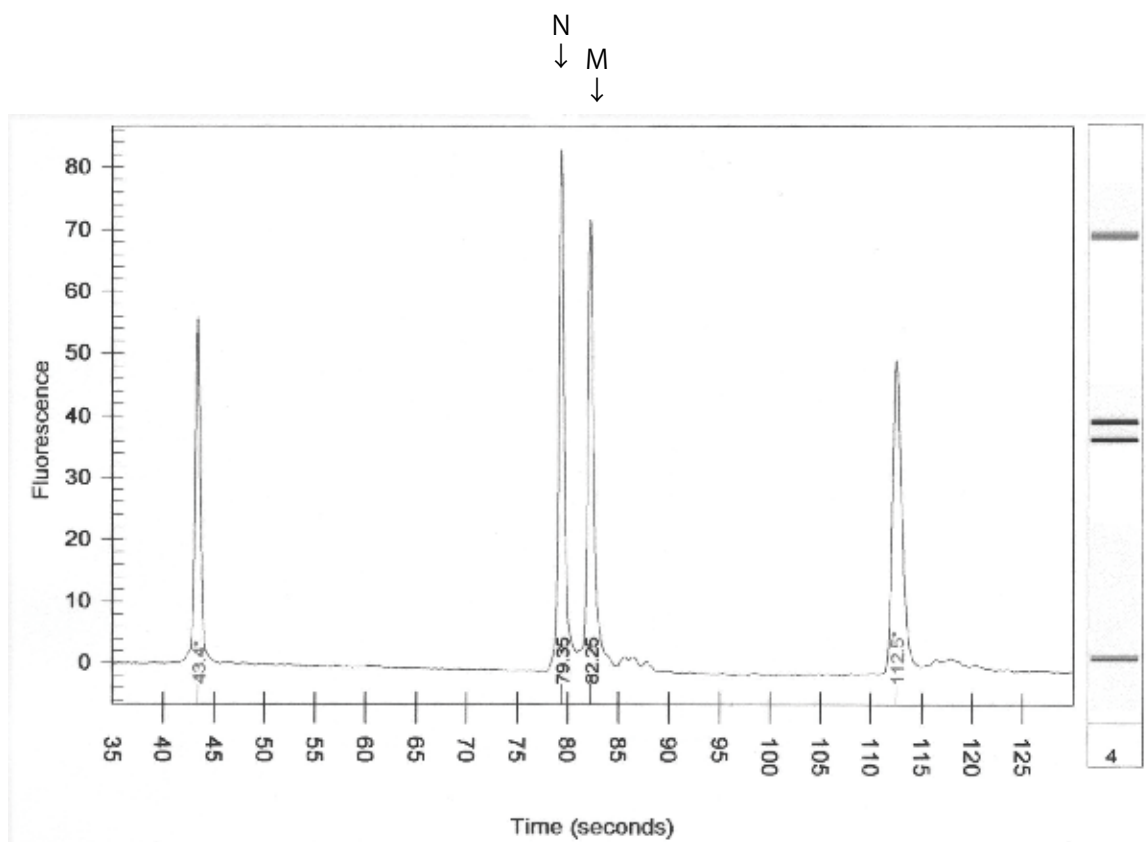
【方法】
AML 患者骨髄ゲノム DNA、Control Template（Mutant）、Control Template（Normal）について、前述の［IV. 操作］に従い PCR を行った。PCR 増幅反応終了後、3% NuSieve™ 3 : 1 アガロースゲルで電気泳動を行い、鎖長を確認した。

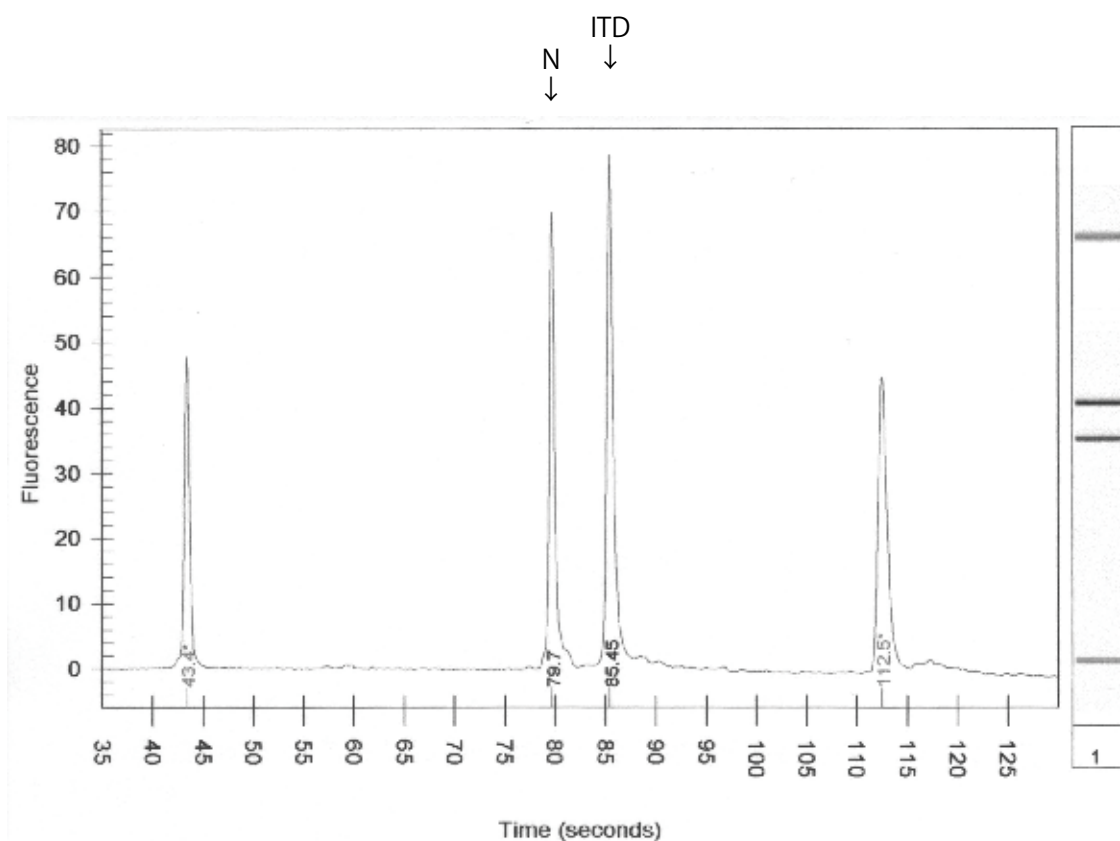
【結果】
Control Template（Normal）においては正常配列の 329 bp のバンドが認められ、Control Template（Mutant）においては 359 bp のバンドが認められた。AML 患者 DNA においては、正常の 329 bp のバンドとともに約 60 bp 長いバンドが認められ、ITD 変異が検出された。

［図 1］AML 患者骨髄ゲノム DNA、Control Template における電気泳動解析例

M：100 bp DNA Ladder Marker
1：AML 患者骨髄ゲノム DNA
2：Control Template（Mutant）：359 bp
3：Control Template（Normal）：329 bp

B. Agilent2100 バイオアナライザによる解析例

【方法】
Control Template（Mutant）、Control Template（Normal）、AML 患者骨髄ゲノム DNA について前述の［IV. 操作］に従い PCR を行い、増幅産物を DNA 1000 LabChip キットを用いアジレント 2100 バイオアナライザにより解析した。

【結果】
Control Template（Mutant）と Control Template（Normal）の増幅産物を混合し、アジレント解析を行ったところ、329 bp に相当する Normal ピークと 359 bp に相当する Mutant ピークが分離した 2 つのピークとして検出された（図 2）。
AML 患者骨髄ゲノム DNA においては、329 bp に相当する正常ピークとともに約 60 bp 長い位置にもうひとつピークが認められ、ITD 変異が検出された（図 3）。

［図 2］Control Template を用いた Agilent2100 バイオアナライザ解析例
横軸は Migration time, 縦軸は Fluorescence を示す。

N：Control Template（Normal）
M：Control Template（Mutant）

［図 3］AML 患者骨髄ゲノム DNA における Agilent2100 バイオアナライザ解析例

N：正常配列
ITD：ITD 変異

VI. 参考文献

1）Nakao M, Yokota S, Iwai T, *et al* (1996) *Leukemia* **10**, 1911-1918
2）Yokota S, Nakao M, Okuda T, *et al* (1997) *Leukemia* **11**, 1605-1609
3）Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, *et al* (1997) *Leukemia* **11**, 1447-1452
4）Kiyoi H, Naoe T, Nakao Y, *et al* (2002) *Blood* **93**, 3074-3080
5）Kiyoi H, Naoe T (2002) *Leukemia and Lymphoma* **43**, 1541-1547
6）Zheng R, Friendman AD, Small D (2002) *Blood* **100**, 4154-4161

VII. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・測定結果：研究以外の目的で行った測定結果の判定に由来して発生したいかなる事象に対し、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
・ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

Agilent2100 バイオアナライザは Agilent Technologies 社の製品です。
LabChip は Caliper Technologies Corporation の登録商標です。

TaKaRa PCR FLT3/ITD Mutation Detection Set は、研究目的にのみ使用が許可されています。その他商用目的での使用にあたっては、別途、タカラバイオ株式会社へお問い合わせください。

タカラバイオ（株）営業部　営業企画
TEL：077-543-7231
FAX：077-543-9254

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

［M31］FLT3/ITD mutation detection

This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 6,846,630 and its foreign counterpart patent claims.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社